



# 植物三萜皂苷生物合成中关键后修饰酶研究进展

黄壮嘉,刘迪秋,葛锋\*,陈朝银

(昆明理工大学 生命科学与技术学院,昆明 650500)

**摘要:**三萜皂苷是由三萜皂苷元、糖基、糖醛酸等组成的C<sub>30</sub>三萜类化合物,是许多药用植物的主要活性成分,具有广泛的药理作用。三萜皂苷的生物合成包括前体和三萜皂苷骨架的形成以及调控皂苷结构多样性的后修饰。三萜皂苷的后修饰包括三萜骨架的氧化/羟基化和糖基化,分别由不同超基因家族编码的细胞色素P450单加氧酶和糖基转移酶进行催化。三萜皂苷通过后修饰最终可形成多种单体皂苷。目前,已在少数植物中识别和确认了个别与三萜皂苷生物合成相关的关键后修饰酶,发现了部分很可能参与后修饰过程的候选基因。该文就近年来国内外有关三萜皂苷生物合成途径关键后修饰酶的研究进行综述,为进一步开展相关研究和对合成精细途径的解析提供参考。

**关键词:**三萜皂苷;后修饰;P450单加氧酶;糖基转移酶

中图分类号:Q946.83; Q789 文献标志码:A

## Advances in Studies on Key Post-modification Enzymes in Triterpenoid Saponins Biosynthesis

HUANG Zhuangjia, LIU Diqu, GE Feng\*, CHEN Chaoyin

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

**Abstract:** Triterpene saponins are glycosides of cyclic C<sub>30</sub> terpenes which consist of triterpenoid saponins, sugar, and uronic acid. They are major active ingredients of many medicinal plants, with a range of pharmacological effects. The biosynthesis of triterpene saponins includes the formation of precursors and skeleton of triterpene saponins, as well as the post-modification that regulates the structure diversity. The post-modification of triterpene saponins mainly includes the oxidation/hydroxylation and glycosylation of triterpene skeleton, which are catalyzed by cytochrome P450 monooxygenase and glycosyltransferase, respectively. They are encoded by different supergene family. By means of post-modification, triterpene saponins can form a variety of monomer saponins in the end. Currently, several key post-modification enzymes which are relative to triterpene saponins biosynthesis have been identified and confirmed in a few plants, and a part of candidate genes that most likely involved in the post-modification process have been found. Studies on key post-modification enzymes in triterpenoid saponins biosynthesis were reviewed in this article, which provided a reference for further correlational research and analysis on fine synthesis pathway.

**Key words:** triterpene saponins; post-modification; P450 monooxygenase; glycosyltransferase

三萜皂苷是许多药用植物如人参(*Panax ginseng*)、三七(*Panax notoginseng*)、积雪草(*Centella asiatica*)和罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)等的重要

活性成分。已知豆类如大豆(*Glycine max*)、豌豆(*Pisum sativum*)和紫花苜蓿(*Medicago sativa L.*)等含有丰富的三萜皂苷<sup>[1]</sup>。三萜皂苷具有广泛的药

收稿日期:2014-05-12;修改稿收到日期:2014-08-31

基金项目:国家自然科学基金(31260070)

作者简介:黄壮嘉(1991—),男,在读硕士研究生,主要从事细胞工程研究。E-mail:18213461126@163.com

\*通信作者:葛锋,博士,教授,主要从事天然产物研究。E-mail:gefeng@tsinghua.org.cn

理作用,如抗血小板,降低胆固醇,抗肿瘤,抗 HIV,抗炎,抗菌等,也可作为免疫佐剂、杀虫剂、杀真菌剂和抗利什曼虫剂使用<sup>[2]</sup>。另外,三萜皂苷元也表现出重要的生物活性,如大豆皂醇 B 有保肝功能<sup>[3]</sup>,齐墩果酸和熊果酸具有抗炎和抗肿瘤活性<sup>[4]</sup>等。皂苷通常被称之为非挥发性的表面活性化合物,疏水性皂苷元和亲水性糖基的结合使皂苷具有两性且能够融入生物膜系统<sup>[5]</sup>。三萜皂苷具有复杂的结构,使得化学合成法在大规模生产中没有经济竞争力,通过超表达参与三萜皂苷生物合成途径关键酶基因的方法可使其产量增加<sup>[6]</sup>。但是,目前对于三萜皂苷生物合成后修饰酶的了解知之甚少。本文着重对三萜皂苷生物合成途径的关键后修饰酶细胞色素 P450 单加氧酶 (P450) 和糖基转移酶 (glycosyltransferase, GT) 研究进展进行综述。

## 1 三萜皂苷的生物合成途径

植物三萜成分的分布是由不同三萜合成酶及其在细胞中的表达水平决定的<sup>[2]</sup>。萜类化合物由 C5 单元异戊烯基焦磷酸(IPP)构成。IPP 可经胞质甲羟戊酸(MVA)途径和质体甲基赤磷酸(MEP)途径合成<sup>[7]</sup>。三萜皂苷骨架是通过类异戊二烯途径合成的<sup>[6]</sup>。鲨烯是三萜皂苷的前体物,由 IPP 通过牻牛儿基焦磷酸合成酶(GPS)、法呢基焦磷酸合成酶(FPS)和鲨烯合酶(SS)催化生成<sup>[8]</sup>。鲨烯环氧酶(SE)将鲨烯转化为 2,3-氧化鲨烯,氧化鲨烯环化酶(OSCs)环化 2,3-氧化鲨烯形成齐墩果烷型、达玛烷型、乌苏烷型和羽扇豆烷型三萜骨架<sup>[9]</sup>。最后通过在骨架上进行后修饰(如氧化/羟基化和糖基化)形成多种三萜皂苷。

## 2 三萜皂苷生物合成的关键后修饰酶

一般情况下,那些采用次级代谢产物作为底物的酶不仅构成了植物细胞蛋白中的一小部分且在次生代谢物合成的最后几步中担当重要角色<sup>[2]</sup>。P450s 为皂苷骨架添加功能基团(如羟基和羰基等),再通过 UDP-糖基转移酶(UDP-glycosyltransferase, UGTs)为皂苷元添加糖基而完成三萜皂苷的合成<sup>[5]</sup>(图 1)。UGTs 是 GTs 最主要的亚家族(家族一)成员,负责皂苷的糖基化<sup>[10]</sup>。

P450s 和 GTs 是植物中两类多基因家族,参与许多代谢过程。在植物中,P450s 利用氧气和 NAD(P)H 催化三萜骨架区域专一性和立体专一性羟基化,扩大了其结构多样性<sup>[11-12]</sup>。P450s 家族的多样

化不仅仅在于三萜底物的碳骨架,且在于反应的目标位置。皂苷共有的特点是存在一个糖链附着于皂苷元上,糖链在某些皂苷的生物活性中处于关键位置<sup>[6]</sup>,可增加三萜的水溶性或改变其生物活性<sup>[7]</sup>,因此糖基化反应非常重要。在植物三萜皂苷的生物合成中,糖基化反应比环化和氧化反应产生更多的结构多样性<sup>[13]</sup>。了解参与三萜骨架后修饰每一个特定步骤的酶类,可有效探究皂苷的生物多样性。

### 2.1 大豆中参与三萜皂苷生物合成的后修饰酶

大豆的皂苷元结构主要是大豆皂醇 A 和 B。大豆皂醇 A 在 olean-12-ene 分子的 C-3、C-21、C-22 和 C-24 位有 4 个羟基,而大豆皂醇 B 在 C-3、C-22 和 C-24 有 3 个羟基<sup>[14]</sup>。根据皂苷元的成分,大豆皂苷可分为 2 类,A 类皂苷和 DDMP(2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one)皂苷<sup>[15]</sup>。A 类皂苷是双糖链型皂苷,在大豆皂醇 A 的 C-3 和 C-22 位羟基上有 2 条糖链。大豆皂醇 B 在 C-22 结合 DDMP 部分和在 C-3 连结 1 条糖链作为 DDMP 皂苷的皂苷元<sup>[16]</sup>。A 类皂苷 Aa 在 C-22 位上有乙酰木糖作为终端乙酰化糖,皂苷 Ab 有乙酰葡萄糖作为终端乙酰化糖<sup>[16]</sup>。拥有乙酰化糖的 A 类皂苷会造成一种苦涩的味道<sup>[17]</sup>。

Shibuya 等<sup>[12]</sup>首先在大豆中鉴别出了 1 个编码三萜化合物羟化酶(CYP93E1)的 cDNA,该酶在 β-香树素和槐花二醇的 C-24 位分别进行羟基化后生成 olean-12ene-3β,24-diol 和大豆皂醇 B。大豆皂醇 B 通过 β-香树素在 C-22 和 C-24 位的两步羟基化完成生物合成。而 CYP93E1 对 3-hydroxyolean-12-ene 结构有底物专一性和区域专一性,只在 C-24 位甲基上进行羟基化。可能是由其他与 CYP93E1 相似的 P450 酶催化 β-香树素或 olean-12ene-3β,24-diol 在 C-22 位的羟基化<sup>[11]</sup>。

大豆皂苷的生物合成由多种糖基转移酶参与<sup>[15]</sup>。Shibuya 等<sup>[18]</sup>通过大豆和蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)的表达序列标签(EST)信息,成功鉴别出在大豆中参与 soyasaponin I 生物合成的 GmSGT2 和 GmSGT3。这是有关糖基转移酶转移第二个或第三个糖基至三萜皂苷上的首篇报道。通过连续地添加葡萄糖醛酸、半乳糖和鼠李糖至大豆皂醇 B 上合成了 Soyasaponin I。体外分析显示 GmSGT2(UGT73P2)从 UDP-半乳糖中转移一个半乳糖基至大豆皂醇 B 单葡萄糖醛酸化物上合成 soyasaponin III,随后 GmSGT3(UGT91H4)从 UDP-鼠李糖中转移一个鼠李糖基至大豆皂苷 III 上合成

soyasaponin I。UGT73P2 和 UGT91H4 不仅参与了大豆皂苷的生物合成且能分别生成带有二糖或三糖的三萜皂苷。该结果也指出三萜皂苷的糖链合成是通过糖基转移至皂苷元上的连续反应来实现。

Takada 等<sup>[15]</sup>对 Sg-3 和 Sg-4 位点的连锁分析发现,这 2 个位点分别控制大豆皂醇 A 和 B 上 C-3 位糖基的糖链组成(即添加葡萄糖残基作为 C-3 的第三个糖基和添加树胶醛糖糖基作为 C-3 的第二个糖基)。控制 A 类皂苷 Af 生产的 Sg-3 位点映射为细胞色素(Chr-)10,控制 DDMP 皂苷  $\beta$ a 生产的 Sg-4 位点映射为 Chr-1。大豆种子胚轴中 A 类皂苷 Ab 和 DDMP 皂苷  $\beta$ a 在 C-3 位的糖基化途径为:皂苷 Af 的前体物经过 UGT73P2 催化生成皂苷 Af,随后经 Sg-3 催化生成皂苷 Ab;皂苷  $\gamma$ a 前体物经过 Sg-4 催化生成皂苷  $\gamma$ a,随后经 UGT91H4 催化生成皂苷  $\beta$ a。

即使大豆 A 类皂苷 Aa、Ab 和 A0- $\alpha$ g 在 C-3 位有相同的糖链序列,但它们在 C-22 位却有不同的糖链序列<sup>[15]</sup>。Sayama 等<sup>[16]</sup>通过遗传分析证明其糖基化结构多样性由单基因位点 Sg-1 的复等位基因决定。它们的序列高度相似且都使无乙酰化的皂苷 A0- $\alpha$ g 糖基化,Sg-1<sup>a</sup> 等位基因编码木糖基转移酶 UGT73F4,而 Sg-1<sup>b</sup> 等位基因编码葡糖基转移酶 UGT73F2。UGT73F4 和 UGT73F2 分别催化添加 Xyl 和 Glc 基团至皂苷 A0- $\alpha$ g 的 C-22 位 Ara residue 上而形成皂苷 Aa 和 Ab。通过同源模型和位点定向突变分析表明 Sg-1<sup>a</sup> 的 Ser-138 和 Sg-1<sup>b</sup> 的 Gly-138 蛋白质是与它们相关的特定糖供体的关键残基。Sg-1 的共显性等位基因 Sg-1<sup>a</sup> 和 Sg-1<sup>b</sup> 分别控制皂苷 Aa 和 Ab 的积累<sup>[19]</sup>。同一位点的隐性等位基因 Sg-1<sup>0</sup> 控制皂苷 A0- $\alpha$ g 的生物合成<sup>[20]</sup>。

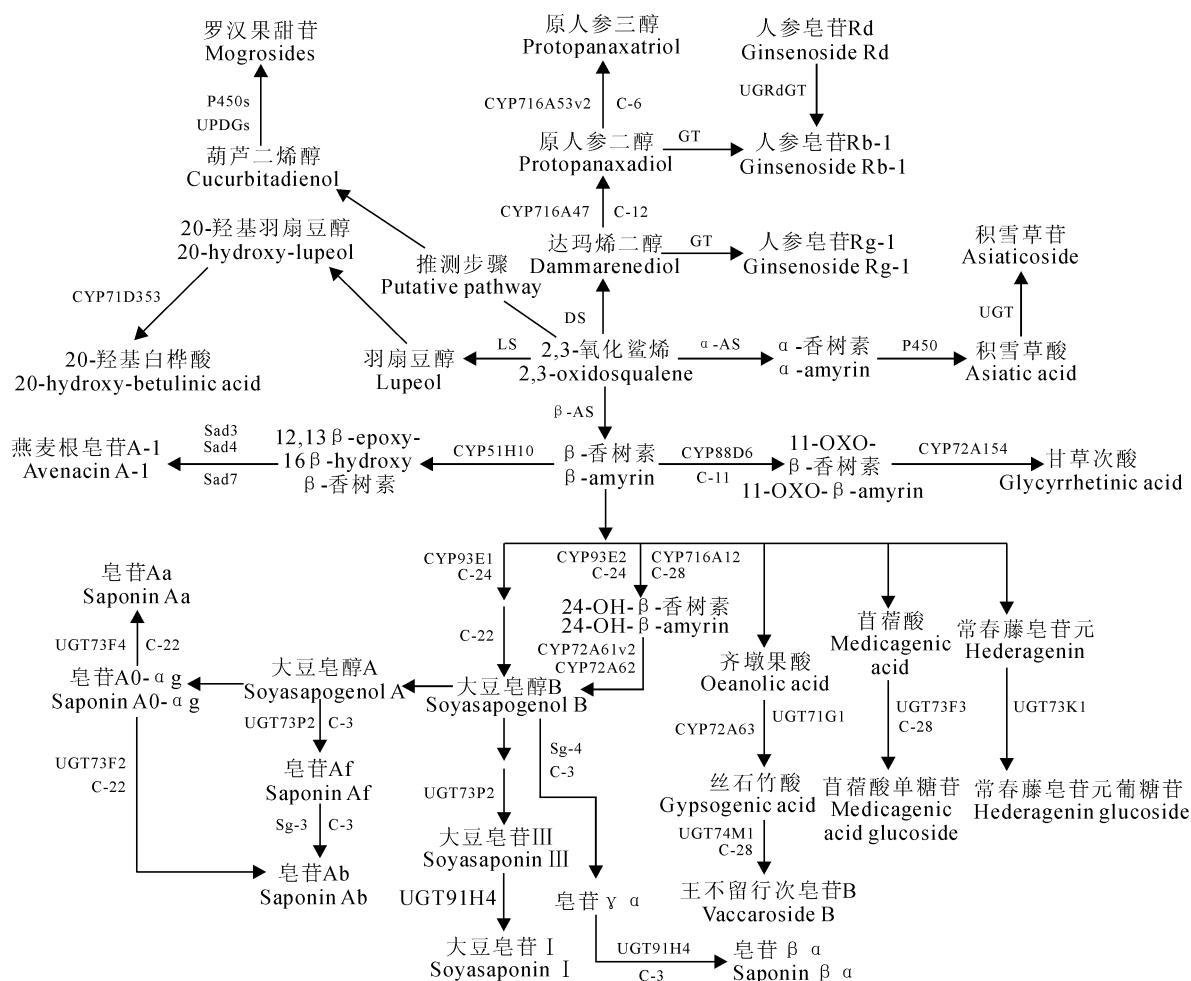


图 1 三萜皂苷生物合成的后修饰

DS. 达玛烯二醇合成酶;LS. 羽扇豆醇合成酶; $\alpha$ -AS.  $\alpha$ -香树素合酶; $\beta$ -AS.  $\beta$ -香树素合酶

Fig. 1 The post-modification of triterpenoid saponins biosynthesis

DS. Dammarenediol-II synthase; LS. Lupeol synthase;  $\alpha$ -AS.  $\alpha$ -amyrin synthase;  $\beta$ -AS.  $\beta$ -amyrin synthase

## 2.2 人参中参与三萜皂苷生物合成的后修饰酶

人参是五加科多年生草本植物,其根部含有药用活性成分人参皂苷<sup>[21]</sup>。人参皂苷可能是目前在分子水平上研究最深入的生物活性皂苷。它们的皂苷元可以分为达玛烷型和齐墩果烷型<sup>[2]</sup>。7种达玛烷型四环三萜化合物(人参皂苷 Rb1、Rb2、Rc、Rd、Re、Rf 和 Rg1)是主要的人参皂苷成分,只有人参皂苷 Ro 是齐墩果烷型五环三萜化合物,由齐墩果酸合成<sup>[22-23]</sup>。达玛烷型人参皂苷依据皂苷元结构的不同可分为 2 组:原人参二醇型(Rb1、Rb2、Rc 及 Rd)和原人参三醇型(皂苷 Rg1、Re、Rf 和 Rg2)<sup>[22]</sup>。研究表明,人参皂苷元(包括原人参二醇和原人参三醇)的生理活性比具有较大分子结构的人参皂苷更强<sup>[24]</sup>。

Han 等<sup>[21]</sup>确认了原人参二醇合酶,它是一个 CYP 酶(CYP716A47),催化达玛烯二醇在 C-12 位的羟基化生成原人参二醇,CYP716A47 基因能被茉莉酸甲酯(MeJA)诱导转录激活。体外酶活性测定显示 CYP716A47 催化达玛烯二醇氧化生成原人参二醇。CYP716A47 可在添加达玛烯二醇的重组酵母中异位表达生成原人参二醇。而且在没有添加达玛烯二醇条件下,DS 和 CYP716A47 在酵母中的共表达可生成原人参二醇。因此,CYP716A47 是一个达玛烯二醇 12-羟化酶,催化达玛烯二醇生成原人参二醇。另外,2 个其它 CYP716A 亚家族基因(CYP716A52v2 和 CYP716A53v2)被分离鉴定<sup>[22]</sup>。CYP716A53v2 编码一种原人参二醇 6-羟化酶,催化原人参二醇 C-6 位羟基化形成原人参三醇。CYP716A47 和 CYP716A53v2 mRNAs 在人参的所有器官中积累,而 CYP716A52v2 mRNA 仅在根茎中积累。在整个培养时期 CYP716A52v2 和 CYP716A53v2 mRNA 都不受 MeJA 处理的影响,而 MeJA 处理可使 CYP716A47 mRNA 在不定根中明显积累。当原人参二醇加入培养介质后,CYP716A53v2 在重组酵母的异位表达导致原人参三醇的生成。体外酶活性测定显示,CYP716A53v2 催化原人参二醇氧化生成原人参三醇。CYP716A53v2 编码一个催化原人参二醇生成原人参三醇的原人参二醇 6-羟化酶,该步骤是形成达玛烷型三萜皂元的重要步骤。

研究表明,CYP716A47 和 CYP716A53v2 都不是多功能酶类<sup>[22]</sup>。多功能活性常在参与豆科植物五环三萜类化合物生物合成的 CYP 酶上发现<sup>[25]</sup>。CYP716A52v2 与蒺藜苜蓿多功能氧化酶 CYP716A12 氨基酸序列有 73%一致性<sup>[26]</sup>,通过系统发育分析可

知 CYP716A52v2 与 CYP716A12、CYP716A15、CYP716A17 的归类相同,这 3 种酶参与了齐墩果烷型三萜的生物合成<sup>[22]</sup>。达玛烷型皂苷元的糖基化也是人参皂苷拥有生物活性所必需的反应步骤<sup>[27]</sup>,一般发生在皂苷元的 C3、C6 和 C20 位上<sup>[28]</sup>。原人参二醇可通过 GT 催化生成 Rb1,原人参三醇可通过另一种 GT 催化生成 Rg1<sup>[29]</sup>。达玛烯二醇的合成可作为人参皂苷生物合成的一个限速步骤,通过 DS 基因的超表达可促进人参皂苷的生物合成<sup>[2]</sup>,而 DS 基因的沉默将导致人参皂苷的产量减少 84.5%<sup>[30]</sup>。

## 2.3 蒺藜苜蓿中参与三萜皂苷生物合成的后修饰酶

Suzuki 等<sup>[31]</sup>在经酵母提取物(YE)或 MJ 诱导的蒺藜苜蓿细胞悬浮培养物中检测到超过 30 种不同的三萜皂苷。来自苜蓿属的皂苷都具有 β-香树素骨架,5 种不同的三萜皂苷元,苜蓿酸、贝萼皂苷元、长春藤皂苷元以及大豆皂醇 B 和 E 已确定为蒺藜苜蓿皂苷的基本骨架<sup>[32]</sup>。基于其取代基的位置和氧化程度,可区分苜蓿的 2 类皂苷(皂苷元):(1)皂苷元(非溶血性皂苷)在 C-24 位上拥有 OH 而在 C-28 位上没有任何取代基;(2)皂苷元(溶血性皂苷)在 C-28 位上拥有 COOH 基团<sup>[26,33]</sup>。这些结果似乎指出 C-24 位的氧化和 C-28 位羧基的存在是互相排斥的<sup>[33]</sup>。

通过遗传学和生物化学相结合的方法,确定了 1 个参与蒺藜苜蓿皂苷生物合成的细胞色素 P450 基因(CYP716A12)<sup>[26]</sup>。CYP716A12 是一种多功能酶,具有 β-香树素 28-氧化酶、α-香树素 28-氧化酶和羽扇豆醇 28-氧化酶活性<sup>[34]</sup>。此外,CYP93E2 催化 β-香树素在 C-24 位的羟基化生成 24-OH-β-香树素<sup>[25]</sup>。Fukushima 等<sup>[35]</sup>也确定了 CYP716A12 和 CYP93E2 是溶血和非溶血皂苷生物合成途径的关键酶。在其他没有表现出 β-香树素氧化酶活性的候选 P450 酶中,CYP72A61v2 基因的表达与 CYP93E2 的表达紧密相关,CYP72A68v2 基因的表达与 CYP716A12 基因的表达紧密相关。通过组合表达方式可检测活性较弱的 P450 酶的活性,在转基因酵母中,蒺藜苜蓿 CYP72A63 和甘草 CYP72A154 共同在 C-30 位上对 β-香树素进行修饰,CYP72A68v2 催化齐墩果酸形成丝石竹酸,CYP72A61v2 和大豆 CYP72A61<sup>[36]</sup>将 24-OH-β-香树素转换成为大豆皂苷元 B。另外,目前还未能实现来自于植物的 P450 酶在转基因酵母中被组合表达生成目标萜类化合物。

Naoumkina 等<sup>[37]</sup>用全面的基因表达聚类分析鉴定参与蒺藜苜蓿三萜骨架糖基化的候选基因。有

4个候选UGTs在大肠杆菌中表达,其中UGT73F3对多种皂苷元表现出特异性且催化常春藤皂苷C-28位羧基的葡萄糖基化。在基因敲除系中3-Glc-28-Glc-苜蓿酸和3-Glc-Ara-28-Glc常春藤皂苷元水平的减少与UGT73F3在C-28位的体外区域专一性相关。苜蓿酸和贝萼皂苷元与常春藤皂苷元一样在C-28位具有羧基,通过UGT73F3的作用,此基因有可能被葡萄糖基化<sup>[37]</sup>。通过对蒺藜苜蓿转录谱和代谢谱的整合分析确认UGT73K1和UGT71G1为三萜糖基转移酶<sup>[38]</sup>。虽说在体外,UGT71G1首选黄酮类而不是三萜类作为底物,完整的转录谱和代谢谱却说明UGT71G1参与了三萜类的生物合成。UGT73K1可糖基化多种皂苷元,包括常春藤皂苷元和大豆皂醇B、E,UGT71G1则专门作用于苜蓿酸。目前这2个UGTs糖基化的位置还没有阐明,但UGT71G1的晶体结构与UDP-葡萄糖和苜蓿酸进行硅片对接模拟表明UGT71G1可转移1个葡萄糖分子至苜蓿酸C-3位的羟基上<sup>[39]</sup>。UGT71G1、UGT73K1和UGT73F3是蒺藜苜蓿主要的糖基转移酶,它们通过转移1个单糖分子到1个三萜皂苷元上生成带有单糖链的三萜皂苷<sup>[6]</sup>。

#### 2.4 甘草中参与三萜皂苷生物合成的后修饰酶

甘草甜素,一种来自于甘草植物地下部分的三萜皂苷,在全世界作为天然甜味剂使用<sup>[40]</sup>。其生物合成包括2,3-氧化鲨烯环化形成三萜骨架β-香树脂素,以及C-11、C-30位的氧化反应和C-3位羟基的糖基化反应<sup>[40]</sup>。Seki等<sup>[41]</sup>以转录谱为基础从甘草ESTs中成功鉴别出了CYP88D6,并进行了酶活分析研究。CYP88D6是甘草甜素生物合成最初始的P450基因,催化β-香树脂素在C-11位两步连续的氧化反应生成11-oxo-β-香树脂素,11-oxo-β-香树脂素可能是β-香树脂素和甘草甜素生物合成的中间物<sup>[41]</sup>。CYP88D6与β-AS在酵母中的共表达催化β-香树脂素氧化生成11-oxo-β-香树脂素。另外,CYP88D6的表达与甘草甜素的器官特异性积累模式相关,它在根部高度表达,并超过在茎部和叶子中的表达量<sup>[42]</sup>。另一个相关的P450基因CYP72A154在内源性生成11-oxo-β-香树脂素的工程酵母菌株中表达,催化11-oxo-β-香树脂素在C-30位三步连续氧化生成甘草次酸<sup>[40]</sup>。CYP72A154也被推测可能在C-22和C-29位上对11-oxo-β-香树脂素进行修饰<sup>[35]</sup>。此外,与大豆CYP93E1和蒺藜苜蓿CYP93E2一样,甘草CYP93E3也催化β-香树脂素C-24位的羟基化<sup>[11,41]</sup>。

通过GO类别分析,得知甘草中与糖基转移酶

有序列相似性的172个独立基因可分为45个类别<sup>[42]</sup>。其中有27个独立基因编码UDP-葡萄糖基转移酶,主要参与多种次级代谢物的合成;有11个独立基因编码葡萄糖基转移酶,可能参与甘草甜素生物合成的最后一步。有6个糖基转移酶基因的表达模式与CYP88D6具有相似性,分别为contig01209、contig03646、contig05219、contig09428、contig09463和contig09686。甘草甜素由皂苷元甘草次酸和两个葡萄糖单位组成,目前在甘草中尚未确认任何编码糖基转移酶基因的功能,上述6个独立基因将成为功能研究的主要对象。

#### 2.5 其它植物中参与三萜皂苷生物合成的后修饰酶

从石竹科王不留行(*Saponaria vaccaria*)发育种子的ESTs中发现UGT74M1基因<sup>[43]</sup>。UGT74M1是一个三萜羧酸葡萄糖基转移酶,通过转移一个活性单糖如尿苷二磷酸葡萄糖至丝石竹酸(齐墩果烷型皂苷元)C-28位的羧基上形成一个酯键。UGT74M1与其它植物中可形成酯类的葡萄糖基转移酶有相似的序列。石竹科家族的大部分皂苷都来源于β-香树脂素,较常见的皂苷元有丝石竹酸和棉根皂苷元。丝石竹酸是一个在C-23和C-28位羧基化的β-香树脂素,与常春藤皂苷有非常相似的结构。在王不留行中存在单糖链和双糖链两种皂苷,根据它们的结构发现其合成步骤包括β-香树脂素在C-16、C-23和/或C-28位的氧化以及C-28位的糖基化。

燕麦(*Avena sativa*)生成抗菌性化合物燕麦素(三萜皂苷),由β-香树脂素氧化、取代及糖苷化后合成<sup>[44]</sup>。Qi等<sup>[45]</sup>确认了一个燕麦皂苷生物合成所需的基因CYP51H10。CYP51H10酶属于CYP51甾醇脱甲基酶家族(最古老的细胞色素P450家族之一),在甾醇的合成中高度保留,仅在单子叶植物中被发现。Geisler等<sup>[46]</sup>用瞬时植物表达系统显示CYP51H10是一种多功能P450酶,能够修饰五环三萜骨架的C和D环生成12,13β-epoxy-3β,16β-dihydroxy-oleanane。利用分子模型和对接实验可知其C-16的羟基化有可能先于C-12,13的环氧化。

北柴胡是中国传统药用植物,柴胡皂苷是北柴胡的主要活性成分。为了生产柴胡皂苷,P450酶催化β-香树脂素氧化形成13,28-环氧基和C-11/C12双键结构或者在C-11/C12和C-13/C18上形成两个双键,UGT酶催化皂苷元C-3的糖基化<sup>[34]</sup>。通过454焦磷酸测序方法,在北柴胡中发现了246个P450s和102个GTs单一序列<sup>[47]</sup>。其中,2个P450s和3个UGTs被鉴定为最有可能参与柴胡皂苷生物

合成的候选基因,其表达模式与 $\beta$ -AS具有较大相似性。利用neighbor-joining树发现BcUGT3与UGT73家族的成员接近,特别是UGT73P2、UGT73F3和UGT73F1。Lin等<sup>[34]</sup>推测高氏柴胡(*Bupleurum kaoi*)齐墩果烷型皂苷元C-3的糖基化可由UGT85As进行催化。这几个候选基因目前正通过在大肠杆菌或酵母中的异源表达和在转基因北柴胡中的超表达以及基因沉默来确认其功能。

积雪草是伞形科多年生植物,具有很好的抗炎疗效,在商业上常作为伤口愈合剂使用<sup>[48]</sup>。它含有多种三萜皂苷,如斯理兰卡积雪草皂苷、积雪草苷、羟基积雪草苷等<sup>[49]</sup>。根据对羟基积雪草苷结构的判断,其后修饰很可能包括 $\alpha$ -香树脂C-2、C-3、C-6和C-24位的羟基化以及C-28位的羧基化<sup>[48]</sup>。经UGT催化,积雪草酸和羟基积雪草酸在C-28位的羧基上结合一个糖基后分别合成积雪草苷和羟基积雪草苷<sup>[48]</sup>。积雪草苷和羟基积雪草苷的共同特征之一是存在一个糖链(glucoglucoside)连接于碳基部分。Kim等<sup>[48]</sup>从EST库中确认了24个P450s和13个UGTs候选基因。通过RT-PCR分析,有3个P450s(EST ID分别为35F09, 46B07, 50B04)和1个UGT(EST ID为35F01)被认为是最有可能参与积雪草皂苷生物合成的基因。

Tang等<sup>[50]</sup>使用测序技术在罗汉果果实发育的3个重要阶段开展基因表达谱分析,选出了7个P450s和5个UDP-葡萄糖基转移酶(UPDGs)基因作为最有可能参与罗汉果甜苷生物合成的基因。罗汉果甜苷为葫芦烷型三萜皂苷,是罗汉果果肉中最主要的生物活性成分。然而,关于罗汉果甜苷的生物合成了解甚少,特别是其合成途径的后期加工、修饰步骤。据推测P450s催化葫芦二烯醇C-6和C-12位的羟基化形成罗汉果醇,UPDGs催化罗汉果醇C-3和C-24位的糖基化形成罗汉果甜苷<sup>[50]</sup>。只有葡萄糖基转移酶而不是糖基转移酶,可催化罗汉果醇形成罗汉果甜苷。利用酿酒酵母对罗汉果中的罗汉果甜苷进行生物转化,证明了Exg 1是一个启动罗汉果甜苷转换的主要酶类<sup>[51]</sup>。

Luo等<sup>[29]</sup>通过系统发育分析在三七174个P450s和242个GTs中发现最有可能参与三七皂苷生物合成的候选P450(Pn02132和Pn00158)和UGT(Pn13895)基因。Pn00158的转录物与西洋参中参与人参皂苷生物合成的候选P450(contig00248)具有高度的同源性<sup>[28]</sup>。Pn02132的氨基酸序列与大豆CYP93E1接近<sup>[29]</sup>。此外,三七CYP716A53v1与人

CYP716A53v2有96.8%的同源性和97.86%的相似性<sup>[22]</sup>。系统进化分析表明有3个UGTs(Pn00082、Pn02086和Pn13895)归属于蒺藜苜蓿糖基转移酶(UGT73K1, UGT71G1)构成的群。其中,Pn13895因其与UGT71G1关系密切,被认为是负责三七皂苷生物合成重要的候选UGT<sup>[29]</sup>。此外,在三七中分离到一个名为UGRdGT的糖基转移酶,此酶催化人参皂苷Rd转换为人参皂苷Rb1<sup>[52]</sup>。Sun等<sup>[28]</sup>在西洋参cDNA文库中发现150个P450s和235个GTs单拷贝序列,经过MeJA诱导实验和基于RT-PCR检测的组织特异性表达模式分析,选出1个P450(contig00248)和4个UGTs(contig01001, contig14976, contig15451和contig16321)作为最有可能参与西洋参中人参皂苷生物合成的候选基因。

在燕麦和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,三萜生物合成途径的基因以代谢基因簇形式存在。在模式豆科植物百脉根(*Lotus corniculatus*)中也鉴定了一个类似的基因簇——侧翼基因组区域环氧角鲨烯环化酶AMY2基因簇(即编码两类不同的P450酶和据预测可能编码还原酶的基因簇)<sup>[53]</sup>。在AMY2催化下,百脉根生成一种新型三萜结构di-hydrolupeol,另外,一种新的P450酶(CYP71D353)被确认,此酶催化20-羟基羽扇豆醇连续三步氧化形成20-羟基白桦酸。

### 3 总结与展望

由于产量较低且不稳定以及自然资源有限等实际性问题,皂苷的商业应用常受到阻碍。通过体外培养,植物可进行无性繁殖且产量不受环境因素的影响,结合代谢工程,使特定基因过量表达来提高皂苷的产量,有可能成为解决药用皂苷不足的有效途径。目前,已有多种方法用于寻找和鉴定与三萜皂苷合成相关的基因。如EST分析可识别新基因和鉴定不同组织中的转录组<sup>[54-55]</sup>;454焦磷酸测序技术为发现参与植物代谢的新基因提供更多的机会<sup>[47]</sup>;表达谱和系统发育树分析也可对候选基因进行鉴别<sup>[50]</sup>。另外,酵母基因敲除突变体是研究皂苷修饰和葡萄糖苷酶功能专一性的重要工具<sup>[51]</sup>。在过去十年中已识别和确认了一定数量的三萜皂苷合成后修饰酶,但仍未实现在某种植物三萜皂苷生物合成途径中确认所有参与三萜皂苷合成的相关酶系及其编码基因。本文归纳了多种植物中与三萜皂苷生物合成后修饰相关的候选基因、ESTs以及其他独立基因,为三萜皂苷合成精细途径的研究提供参考。

**参考文献:**

- [1] WALLER G R, YAMASAKI K. Saponins Used in Food and Agriculture: Advances in Experimental Medicine and Biology[M]. Great Britain: Elsevier, 1997: 569.
- [2] YENDO A C, COSTA F D, GOSMANN G, et al. Production of plant bioactive triterpenoid saponins: elicitation strategies and target genes to improve yields[J]. *Mol. Biotechnol.*, 2010, **46**(1): 94–104.
- [3] SASAKI K, MINOWA N, KUZUHARA H, et al. Synthesis and hepatoprotective effects of soyasapogenol B derivatives[J]. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, **7**(1): 85–88.
- [4] BANNO N, AKIHISA T, TOKUDA H, et al. Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects[J]. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2004, **68**(1): 85–90.
- [5] AUGUSTIN J M, DROK S, SHINODA T, et al. UDP-glycosyltransferases from the UGT73C subfamily in *Barbarea vulgaris* catalyze saponin 3-O-glucosylation in saponin-mediated insect resistance[J]. *Plant Physiology*, 2012, **160**(4): 1 881–1 895.
- [6] LAMBERT E, FAIZAL A, GEELEN D. Modulation of triterpene saponin production: *in vitro* cultures, elicitation, and metabolic engineering[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, **164**(2): 220–237.
- [7] SAWAI S, SAITO K. Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants[J]. *Frontier in Plant Science*, 2011, **2**(25): 1–8.
- [8] KUZUYAMA T. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2002, **66**(8): 1 619–1 627.
- [9] SHIBUYA M, KATSUBE Y, OTSUKA M, et al. Identification of a product specific  $\beta$ -amyrin synthase from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, **47**(1): 26–30.
- [10] WANG X Q. Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases[J]. *FEBS Letters*, 2009, **583**(20): 3 303–3 309.
- [11] NELSON D R, SCHULER M A, PAQUETTE S M, et al. Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot[J]. *Plant Physiol.*, 2004, **135**(2): 756–772.
- [12] SHIBUYA M, HOSHINO M, KATSUBE Y, et al. Identification of  $\beta$ -amyrin and sophoradiol 24-hydroxylase by expressed sequence tag mining and functional expression assay[J]. *FEBS Journal*, 2006, **273**(5): 948–959.
- [13] PHILLIPS D R, RASBERY J M, BARTEL B, et al. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, **9**(3): 305–314.
- [14] KITAGAWA I, YOSHIKAWA M, WANG H K, et al. Revised structures of soyasapogenol A, soyasapogenol B, and soyasapogenol E, oleanene sapogenols from soybean, structures of soyasaponin I, soyasaponin II, and soyasaponin III[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1982, **30**(6): 2 294–2 297.
- [15] TAKADA Y, TAYAMA I, SAYAMA T, et al. Genetic analysis of variations in the sugar chain composition at the C-3 position of soybean seed saponins[J]. *Breeding Science*, 2012, **61**(5): 639–645.
- [16] SAYAMA T, ONO E, TAKAGI K, et al. The Sg-1 glycosyltransferase locus regulates structural diversity of triterpenoid saponins of soybean[J]. *The Plant Cell*, 2012, **24**(5): 2 123–2 138.
- [17] OKUBO K, IIJIMA M, KOBAYASHI Y, et al. Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds[J]. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1992, **56**(1): 99–103.
- [18] SHIBUYA M, NISHIMURA K, YASUYAMA N, et al. Identification and characterization of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of soyasaponin I in *Glycine max*[J]. *FEBS Letters*, 2010, **584**(11): 2 258–2 264.
- [19] TSUKAMOTO C, KIKUCHI A, HARADA K, et al. Genetic and chemical polymorphisms of saponins in soybean seed[J]. *Phytochemistry*, 1993, **34**(5): 1 351–1 356.
- [20] TAKADA Y, SAYAMA T, KIKUCHI A, et al. Genetic analysis of variation in sugar chain composition at the C-22 position of group A saponins in soybean, *Glycine max* (L.) Merrill[J]. *Breeding Science*, 2010, **60**(1): 3–8.
- [21] HAN J Y, KIM H J, KWON Y S, et al. The Cyt P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2011, **52**(12): 2 062–2 073.
- [22] HAN J Y, HWANG H S, CHOI S W, et al. Cytochrome P450 CYP716A53v2 catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2012, **53**(9): 1 535–1 545.
- [23] SHIBATA S. Saponins with Biological and Pharmacological Activity. In New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity[M]. Berlin: Springer, 1977: 177–196.
- [24] JIA W, YAN H, BU X, et al. Aglycone protopanaxadiol, a ginseng saponin, inhibits P-glycoprotein and sensitizes chemotherapy drugs on multidrug resistant cancer cells[J]. *J. Clin. Oncol.*, 2004, **22**(14): 9 663.
- [25] FUKUSHIMA E O, SEKI H, OHYAMA K, et al. CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2011, **52**(12): 2 050–2 061.
- [26] CARELLI M, BIAZZI E, PANARA F, et al. *Medicago truncatula* CYP716A12 is a multifunctional oxidase involved in the biosynthesis of hemolytic saponins[J]. *The Plant Cell*, 2011, **23**(8): 3 070–3 081.
- [27] WU Q, SONG J, SUN Y, et al. Transcript profiles of *Panax quinquefolius* from flower, leaf and root bring new insights into genes related to ginsenosides biosynthesis and transcriptional regulation[J]. *Physiologia Plantarum*, 2010, **138**(2): 134–149.
- [28] SUN C, LI Y, WU Q, et al. *Denovo* sequencing and analysis of the American ginseng root transcriptome using a GS FLX Titanium platform to discover putative genes involved in ginsenoside biosynthesis[J]. *BMC Genomics*, 2010, **11**(1): 262.

- [29] LUO H,SUN C,SUN Y,*et al.* Analysis of the transcriptome of *Panax notoginseng* root uncovers putative triterpene saponin-biosynthetic genes and genetic markers[J]. *BMC Genomics*,2011,12(S 5):S5.
- [30] HAN J Y,KWON Y S,YANG D C,*et al.* Expression and RNA interference-induced silencing of the dammarenediol synthase gene in *Panax ginseng*[J]. *Plant and Cell Physiology*,2006,47(12):1 653—1 662.
- [31] SUZUKI H,REDDY M S,NAOUMKINA M,*et al.* Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*[J]. *Planta*,2005,220(5):696—707.
- [32] HUHMAN D V,BERHOW M A,SUMNER L W. Quantification of saponins in aerial and subterranean tissues of *Medicago truncatula*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,2005,53(6):1 914—1 920.
- [33] TAVA A,SCOTTI C,AVATO P. Biosynthesis of saponins in the genus *Medicago*[J]. *Phytochemistry Reviews*,2011,10(4):459—469.
- [34] LIN T Y,CHIOU C Y,CHIOU S J. Putative genes involved in saikogenin biosynthesis in *Bupleurum* species[J]. *International Journal of Molecular Sciences*,2013,14(6):12 806—12 826.
- [35] FUKUSHIMA E O,SEKI H,SAWAI S,*et al.* Combinatorial biosynthesis of legume natural and rare triterpenoids in engineered yeast [J]. *Plant and Cell Physiology*,2013,54(5):740—749.
- [36] EBIZUKA Y,SHIBUYA M,WAKITA E. C-22 hydroxylase:U. S,US20110171698 A1[P]. Jul 14,2011.
- [37] NAOUMKINA M A,MODOLO L V,HUHMAN D V,*et al.* Genomic and coexpression analyses predict multiple genes involved in triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*[J]. *The Plant Cell*,2010,22(3):850—866.
- [38] ACHNINE L,HUHMAN D V,FARAG M A,*et al.* Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*[J]. *The Plant Journal*,2005,41(6):875—887.
- [39] SHAO H,HE X,ACHNINE L,*et al.* Crystal structures of a multifunctional triterpene/flavonoid glycosyltransferase from *Medicago truncatula*[J]. *The Plant Cell*,2005,17(11):3 141—3 154.
- [40] SEKI H,SAWAI S,OHYAMA K,*et al.* Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin[J]. *The Plant Cell*,2011,23(11):4 112—4 123.
- [41] SEKI H,OHYAMA K,SAWAI S,*et al.* Licorice  $\beta$ -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,2008,105(37):14 204—14 209.
- [42] LI Y,LUO H M,SUN C,*et al.* EST analysis reveals putative genes involved in glycyrrhizin biosynthesis[J]. *BMC Genomics*,2010,11(1):1—11.
- [43] MEESAPYODSUK D,BALSEVICH J,REED D W,*et al.* Saponin biosynthesis in *Saponaria vaccaria*. CDNA encoding  $\beta$ -amyrin synthase and a triterpene carboxylic acid glucosyltransferase[J]. *Plant Physiol.*,2007,143(2):959—969.
- [44] TROJANOWSKA M R,OSBOURN A E,DANIELS M J,*et al.* Biosynthesis ofavenacins and phytosterols in roots of *Avena sativa* cv. *image*[J]. *Phytochemistry*,2000,54(2):153—164.
- [45] QI X,BAKHT S,QIN B,*et al.* A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family:from essential sterols to plant defense[J]. *Proceedings of the National Academy of Science,USA*,2006,103(49):18 848—18 853.
- [46] GEISLER K,HUGHES R K,SAINSBURY F,*et al.* Biochemical analysis of a multifunctional cytochrome P450 (CYP51) enzyme required for synthesis of antimicrobial triterpenes in plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,2013,110(35):3 360—3 367.
- [47] SUI C,ZHANG J,WEI J,*et al.* Transcriptome analysis of *Bupleurum chinense* focusing on genes involved in the biosynthesis of saikogenins[J]. *BMC Genomics*,2011,12(1):1—16.
- [48] KIM O T,UM Y,JIN M L,*et al.* Analysis of expressed sequence tags from *Centella asiatica* (L.) Urban hairy roots elicited by methyl jasmonate to discover genes related to cytochrome P450s and glucosyltransferases[J]. *Plant Biotechnology Reports*,2014,8(2):211—220.
- [49] JAMES J T,DUBERY I A. Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban[J]. *Molecules*,2009,14(10):3 922—3 941.
- [50] TANG Q,MA X,MO C,*et al.* An efficient approach to finding *Siraitia grosvenorii* triterpene biosynthetic genes by RNA-seq and digital gene expression analysis[J]. *BMC Genomics*,2011,12(1):1—13.
- [51] CHIU C H,WANG R,LEE C C,*et al.* Biotransformation of Mogrosides from *Siraitia grosvenorii* Swingle by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,2013,61(29):7 127—7 134.
- [52] YUE C J,ZHONG J J. Purification and characterization of UDPG:ginsenoside Rd glucosyltransferase from suspended cells of *Panax notoginseng*[J]. *Process Biochemistry*,2005,40(12):3 742—3 748.
- [53] KROKIDA A,DELIS C,GEISLER K,*et al.* A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis[J]. *New Phytologist*,2013,200(3):675—690.
- [54] SHU Q Y,WISCHNITZKI E,LIU Z A,*et al.* Functional annotation of expressed sequence tags as a tool to understand the molecular mechanism controlling flower bud development in tree peony[J]. *Physiologia Plantarum*,2009,135(4):436—449.
- [55] LUO H,SUN C,LI Y,*et al.* Analysis of expressed sequence tags from the *Huperzia serrata* leaf for gene discovery in the areas of secondary metabolite biosynthesis and development regulation[J]. *Physiologia Plantarum*,2010,139(1):1—12.